刺血疗法结合壮医药线点灸对急性痛风性关节炎大鼠 TLRs/MyD88 信号通路的影响

朱丹萌，黄玉莹，罗统安，等. 刺血疗法结合壮医药线点灸对急性痛风性关节炎大鼠 TLRs/MyD88 信号通路的影响［J］. 中国全科医学，2022. ［Epub ahead of print］. DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2022.0775

朱丹萌[1]，黄玉莹[1]，罗统安[1]，贺长源[1]，陈日兰[2*]

基金项目：1. 国家自然科学基金资助项目“基于 TLRs/ MyD88 与 NLRP3 通路的刺血疗法与壮医药线点灸对痛风性关节炎大鼠作用机制研究”(项目编号：81960908)2. 广西中医药大学 2021 年研究生教育创新计划项目“刺血疗法对痛风性关节炎大鼠关节滑膜组织 TLRs/MyD88 信号通路的影响”（项目编号：YCXJ2021092）

1. 530001 广西南宁市，广西中医药大学
2.530011 广西南宁市，广西中医药大学附属瑞康医院针灸科
通讯作者*:陈日兰，主任医师，教授，硕士研究生导师；E-mail:lanlani10000@163.com

【摘要】 **背景** 随着人们环境及饮食结构的的改变，急性痛风性关节炎（AcuteGouty Arthritis，AGA）已成为临床常见疾病，AGA 易反复发作对患者健康造成危害，临床工作中刺血疗法结合壮医药线点灸对 AGA 有确切的疗效，但其作用机制尚未十分明确。**目的** 基于 TLRs/MyD88 信号通路探讨刺血疗法结合壮医药线点灸治疗急性痛风性关节炎的作用机制。**方法** 将 60 只 SD 大鼠随机分为 6 组，分别为空白组、模型组、刺血组、药线组、秋水仙碱组、刺血结合药线组，每组 10 只。除空白组外，其余各组均将尿酸钠悬浮液注入大鼠右踝关节腔内制备 AGA 模型，于造模 24h 后秋水仙碱组予秋水仙碱悬浮液灌胃治疗，刺血疗法组予阿是穴点刺放血治疗，药线组予壮医药线围灸病灶处，刺血结合药线组先予阿是穴点刺放血再行围灸法。观察造模后 6h、12h、24h、72h 右踝关节肿胀程度；HE 染色观察右踝关节滑膜组织病理改变；采用 ELISA 检测大鼠血清中白细胞介素 10（IL-10）、白细胞介素 8（IL-8）及环氧化酶-2（COX-2）水平；Western blot 检测右踝关节滑膜组织中 MyD88 和 IKK-β 蛋白表达。**结果** 各实验组大鼠经干预治疗后，与模型组相比，均降低了踝关节肿胀度($P<0.05$)；与模型组相比，刺血组、药线组、秋水仙碱组及刺血结合药线组大鼠血清中 IL-8、COX-2 水平下降，IL-10 水平升高（$P<0.05$），其中刺血结合药线组与秋水仙碱组疗效相当；与模型组相比，治疗各组 MyD88 和 IKK-β 蛋白表达水平明显下降（$P<0.01$），刺血结合药线组与秋水仙碱组无显著差异；**结论** 刺血疗法结合壮医药线点灸能通过调节 TLRs/MyD88 信号通路来改善 AGA 关节炎性症状，起到治疗作用，刺血疗法结合壮医药线点灸可能是 AGA 的潜在替代疗法。

【关键词】 急性痛风性关节炎 ；刺血疗法 ；壮医药线点灸；TLRs/MyD88 通路

Effect of blood pricking therapy combined with Zhuang-medicine-thread moxibustion on TLRs/MyD88 signal pathway in rats with acute gouty arthritis

ZHU Dan-meng[1]，HUANG Yu-ying[1]，LUO Tong-an[1],HE Chang-yuan[1],CHEN Ri-lan[2]*
1. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine ,Nanning 530001，China
2. Department of Acupuncture and Moxibustion, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530011, China
*Corresponding author *: CHEN Ri-lan, Chief physician, Professor, Postgraduate tutor;*
E-mail:lanlani10000@163.com

[Abstract] **Background** With the change of people's environment and diet structure, acute gouty arthritis (AGA) has become a common clinical disease. AGA is easy to recur and cause harm to patients' h

ealth. In clinical work, blood pricking therapy combined with Zhuang medicine thread moxibustion has a definite therapeutic effect on AGA, but its mechanism of action is not very clear. **Objective** To explore the mechanism of acupuncture combined with Zhuang-medicine-thread moxibustion in the treatment of ac ute gouty arthritis based on TLRs/MyD88 signal pathway. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into 6 groups: blank group, model group, blood pricking group, Zhuang-medicine-thread moxibustion grou p, colchicine group, blood pricking combined Zhuang-medicine-thread moxibustion group, with 10 rats in e ach group. Except the blank group, the other groups all injected sodium urate suspension into the right an kle joint cavity of rats to prepare AGA model, and colchicine group was given colchicine suspension by gavage 24 hours after modeling, blood pricking therapy group was given Ashi point pricking and bloodlett ing therapy, Zhuang-medicine-thread moxibustion group was given Zhuang-medicine-thread moxibustion to moxibustion around the focus, and blood pricking combined with Zhuang-medicine-thread moxibustion grou p was given Ashi point pricking and bloodletting therapy before surrounding moxibustion. The swelling de gree of the right ankle joint was observed at 6h, 12h, 24h and 72h after modeling; HE staining was used to observe the pathological changes of synovium of right ankle joint; The serum levels of interleukin-10 (IL-10), interleukin-8 (IL-8) and cyclooxygenase-2 (COX-2) were measured by ELISA; Detection of MyD8 8 and IKK- β in synovial tissue of right ankle joint by Western blot Protein expression. **Results** Compar ed with the model group, the degree of ankle swelling was decreased in all experimental groups after inte rvention ($P < 0.05$). Compared with the model group, the levels of IL-8 and COX-2 in serum of rats in the pricking blood group, Zhuang-medicine-thread moxibustion group, colchicine group and the pricking bl ood combination Zhuang-medicine-thread moxibustion group were decreased, and the level of IL-10 was in creased ($P < 0.05$). The efficacy of the pricking blood combination Zhuang-medicine-thread moxibustion g roup was similar to that of the colchicine group. Compared with the model group, the protein expression levels of MyD88 and IKK-β in the treatment groups were significantly decreased ($P < 0.01$), and there w as no significant difference between the pricking blood combination Zhuang-medicine-thread moxibustion group and the colchicine group. **Conclusions** Blood pricking therapy combined with Zhuang-medicine-thre ad moxibustion can improve the symptoms of AGA joint inflammation by regulating TLRs/MyD88 signali ng pathway, and play a therapeutic role. Blood pricking therapy combined with Zhuang-medicine-thread m oxibustion may be a potential alternative therapy for AGA.

[Key words] acute gouty arthritis; Pricking blood therapy; Zhuang medicine line moxibustion; TLRs/MyD 88 pathways

痛风性关节炎（gouty arthritis，GA）是一种代谢性疾病，是由于尿酸钠晶体（monosodium urate monohydrate，MSU）沉积在关节腔引起的关节炎[1]，急性发作时常表现为病变关节红肿、局部肤温升高、疼痛剧烈，具有起病急，易反复，预后差特点。在我国大约有 1.1% 的人口患有痛风性关节炎[错误!未找到引用源。]，发病率逐年升高[错误!未找到引用源。]，并且年轻化趋势越发明显。有研究表明，随着痛风性关节炎发病率的上升，其与肥胖、高血压、高脂血症、糖尿病、肾病等合并症几率也会跟着上升[2]，严重影响患者的健康、生活质量以及造成经济上的负担[45]。

中医认为痛风性关节炎急性发作时其病机主要为毒热、痰湿交结于关节，以实热证为主。刺血疗法是中医外治疗法中的一种，即在病变部位迅速点刺以泄出一定量的血来达到泄热、活血化瘀作用。壮医药线点灸为极具岭南地区特色的一种民族医药疗法，选取相关穴位利用壮医药线来进行点灸，通过药线的温热及药效对穴位进行刺激，使通路传导通畅，三气复归同步来引热外出、散瘀活血，消炎止痛等。现代研究则认为[错误!未找到引用源。][7]通过壮医药线点灸及刺血疗法可能与通过上调局部抗炎因子来发挥其抗炎作用，减少炎症细胞浸润，改善 GA 局部组织坏死，促进受损关节功能恢复等作用有关。无论是刺血疗法亦或是壮医药线点灸，其操作均十分简便，有确切的疗效，不良反应较小，经济负担较轻，尤为适合在基层医院大力推

广。

1 材料与方法

1.1 设计 随机对照动物实验

1.2 地点 实验于广西中医药大学科学实验中心及方药重点实验室完成。

1.3 材料 SPF 级 SD 雄性大鼠 60 只，体重 200±20g，购于湖南斯莱克公司，实验动物许可证号：SCXK（湘）2019-0004。取得广西中医药大学伦理委员会批准（编号：DW20210426-055）。饲养条件：室温（22 ± 1）℃，湿度（50 ±10）%，实行 12 h：12 h 光暗照明循环，保持动物房环境安静。秋水仙碱（合肥博美生物科技有限公司，型号 QC8624-100mg）；尿酸钠（美国 SIGMA 公司，型号 U2875-5g）；苏木素-伊红试剂盒购于武汉百仟度生物科技有限公司；环氧化酶 2（COX-2）、白细胞介素 8（IL-8）、白细胞介素 10（IL-110）酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒购自 Biowamp 公司；BCA 蛋白定量试剂盒购自 BIOSHARP 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 实验动物分组 SD 大鼠适应性饲养 7 d 后，将 60 只大鼠随机分为 6 组，分别为空白组、模型组、刺血组、药线组，秋水仙碱组、刺血结合药线组，每组 10 只。实验大鼠均分笼饲养于广西中医药大学科学实验中心 SPF 级动物实验室，自由进食饮水，定期清洁、消毒。

1.4.2 动物模型的复制 将大鼠放至小动物麻醉机中吸入异氟烷麻醉后，用 1ml 注射器抽取 0.2ml 的尿酸钠悬浮液，于大鼠右侧踝关节后侧约 30°～40° 方向进针进入关节腔内，此时针下有明显的落空感，将 0.2mL 尿酸钠悬浮液注入到关节腔内，踝关节对侧关节囊鼓起即为注射成功。空白组为将 0.2 mL 生理盐水注射至右侧踝关节腔内。

1.4.3 治疗方式 于造模 24h、48h、72h 后进行干预治疗，每次治疗前对大鼠进行称重，灌胃标准为每 100g 灌胃 1ml。秋水仙碱治疗组予浓度为 5%秋水仙碱混悬液进行灌胃；刺血疗法组选取 AGA 大鼠右踝关节局部最肿胀点即阿是穴用 6 号注射针头在该处进行点刺放血，每只大鼠放血量约为 0.1ml 左右。药线组沿着大鼠右踝最肿胀部位进行壮医梅花围灸法进行药线点灸，即以右踝最肿胀部位为中心点，围着中心点环形均匀点灸 6 壮。刺血结合药线组则为两种治疗方法结合进行治疗，操作方法与刺血组和药线组一致，即在右踝关节阿是穴处先进行刺血疗法后再进行壮医药线梅花围灸法治疗。除秋水仙碱治疗组以外的各组大鼠均进行纯水灌胃。

1.4.4 标本采集 治疗结束后，10%水合氯醛对大鼠进行腹腔注射麻醉后将腹腔打开充分暴露腹主动脉进行采血，放置离心机进行离心，取其上清液分装至 EP 管放入-80℃冰箱冻存用于 ELISA 检测。取血结束后立即处死大鼠，充分打开右踝关节腔，可看到关节软骨下的淡黄透亮光滑有韧性的组织，即为关节滑膜，每组随机选取 7 只大鼠右踝关节滑膜组织放至冻存管保存于液氮中用于 Western blotting 检测，将剩下 3 只大鼠右踝关节取下后，放至离心管中，加入 4%的多聚甲醛溶液使组织固定用于病理检测。

1.5 观察的指标

1.5.1 右踝关节肿胀度 观察造模后 6h、12h、24h、48h、72h 右踝关节肿胀度，在干预治疗前采取游标卡尺测量各组大鼠右踝关节内外踝横截面直径，每一次每一只大鼠连续测量右踝关节 3 次，读取数值取平均值并记录。

1.5.2 病理学染色 将右踝关节滑膜组织加入 4%多聚甲醛固定，依次梯度乙醇进行脱水，将样品包埋在石蜡中并切成 4μm 的切片。严格按照 HE 染色试剂盒说明书步骤进行操作，中性树胶封片，在显微镜下观察右踝关节滑膜组织病理改变。

1.5.3 ELISA 检测 按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作，检测各组大鼠血清 IL-8、IL-10、COX-2 水平。

1.5.4 蛋白免疫印迹 取各组大鼠右踝关节滑膜组织，加入裂解液进行组织裂解提取总蛋白，使用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度测定，上样、电泳、转膜，通过 5%脱脂牛奶封闭 1 小时来封闭膜。加入一抗即 MyD88、IKK-β 和以及 GAPDH 抗体，4℃低温孵育过夜，将膜用 TBS-T 缓冲液洗 5 次，加入相应的二抗在 37 ℃下孵育 1h，洗膜后，使用 ECL 使蛋白质条带可视化并采集图像进行分析。

1.6 统计学 选用 SPSS 21.0 进行相关数据的统计和分析，计量资料结果用均数±标准差来表示，组间比较

使用 LSD 法检验进行统计分析，$P<0.05$ 具有统计学意义。

2　结果

2.1　各组大鼠的一般情况　空白组大鼠正常进食饮水，精神状态方面良好，毛发颜色自然有光泽，活动自如，反应迅速，动作敏捷；模型组大鼠精神状态不佳，进食减少，毛发粗糙暗黄杂乱无序，右踝局部肤温升高，发红肿胀，活动量明显减少；与模型组大鼠相比，治疗后各组大鼠较模型组大鼠情况均改善明显；秋水仙碱组大鼠出现腹泻，刺血组、药线组及刺血结合药线组大鼠二便正常。

2.2　各组大鼠造模后右踝关节肿胀度　各个时间点的空白组大鼠右踝关节无明显变化，余各组大鼠右踝关节肿胀程度于造模后 12h 达到最高峰，随后有所下降。与模型组相比，造模 48h、72h 后刺血组、药线组、秋水仙碱组及刺血结合药线组大鼠右踝关节肿胀程度均有所下降，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。造模 72 h 后，与空白组相比，刺血结合药线组与空白组之间差异无统计学意义（$P>0.05$）。详见表 1。

表 1　各组大鼠造模后右踝关节肿胀程度（n ＝ 10，cm，x±s）

Table 1　Swelling degree of right ankle joint of rats in each group after modeling (n=10, cm, x ± s)

组别	6h	12h	24h	48h	72h
空白组	0.71±0.02	0.71±0.03	0.71±0.04	0.72±0.04	0.71±0.04
模型组	$0.97±0.03^{**}$	$1.06±0.07^{**}$	$0.97±0.08^{**}$	$0.89±0.06^{**}$	$0.85±0.05^{**}$
刺血组	$0.95±0.05^{**}$	$1.05±0.06^{**}$	$0.94±0.09^{**}$	$0.84±0.04^{**\#}$	$0.8±0.05^{**\#}$
药线组	$0.97±0.07^{**}$	$1.08±0.06^{**}$	$0.97±0.07^{**}$	$0.84±0.06^{**\#}$	$0.81±0.06^{**\#}$
秋水仙碱组	$0.95±0.06^{**}$	$1.04±0.07^{**}$	$0.96±0.11^{**}$	$0.8±0.05^{**\#\#}$	$0.76±0.04^{*\#\#}$
刺血结合药线组	$0.95±0.07^{**}$	$1.08±0.08^{**}$	$0.95±0.08^{**}$	$0.78±0.05^{*\#\#}$	$0.74±0.03^{\blacktriangle\#\#}$

注:与空白组比较，$^{\blacktriangle}P>0.05$，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；造模 48h、72h 后与模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

2.3　各组大鼠右踝关节滑膜组织病理变化影响　空白组大鼠右踝关节滑膜组织及细胞结构完整，胶原纤维有序排列，组织未见有明显炎症细胞；模型组大鼠右踝关节滑膜组织严重损伤，大面积坏死脱落，可见大量炎症细胞浸润。刺血组、药线组、秋水仙碱组及刺血结合药线组右踝关节其炎性细胞的浸润情况均有不同程度的改善。详见图 1。

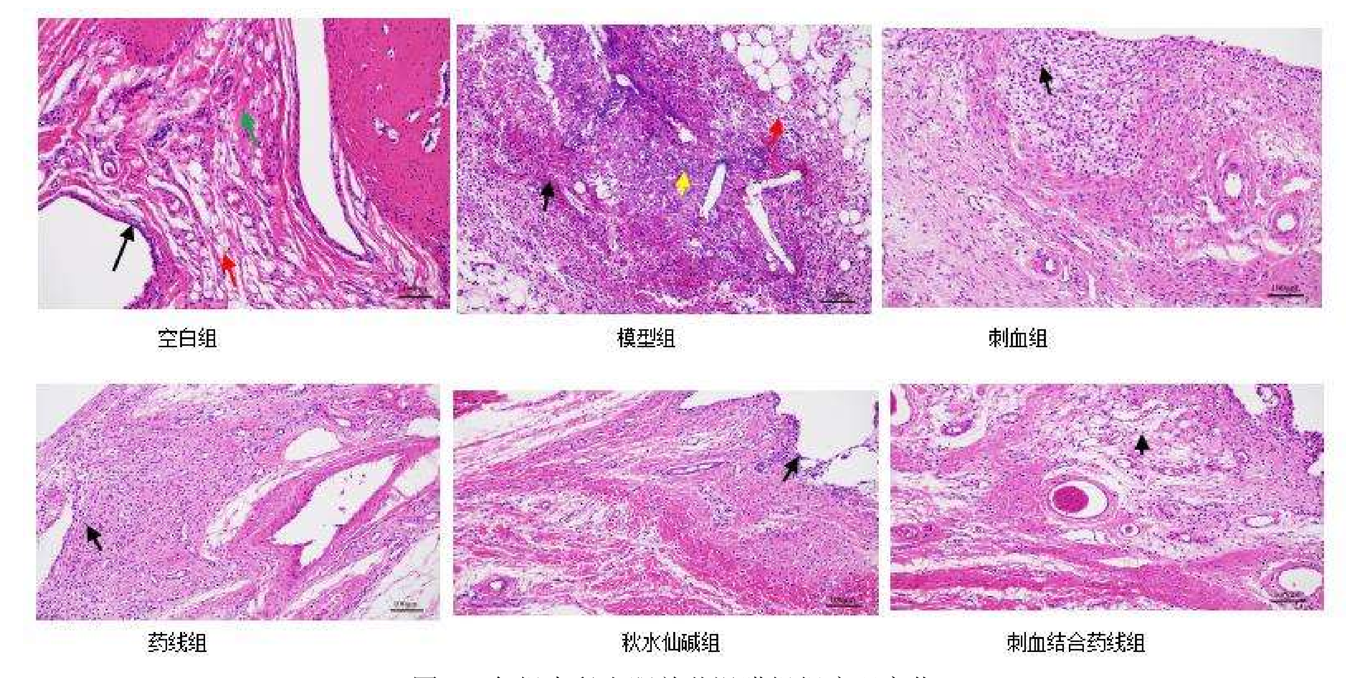


图 1　各组大鼠右踝关节滑膜组织病理变化

FIG. 1　Pathological changes of synovial tissue of the right ankle of rats in each group

注:空白组：黑色箭头：上皮结构完整；绿色箭头：胶原纤维排列有序；红色箭头：完整脂肪细胞。模型组：黑色箭头：区域

炎性细胞浸润及出血坏死；黄色箭头：组织大面积坏死，细胞大量消失；红色箭头：周围组织结构紊乱，区域大量炎症细胞浸润；刺血组：黑色箭头：区域胶原纤维排列紊乱，可见炎症细胞浸润；药线组：黑色箭头：区域胶原纤维排列紊乱，可见炎症细胞浸润；秋水仙碱组：黑色箭头：部分区域上皮细胞变性脱落，周围可见少量炎症细胞浸润；刺血结合药线组：黑色箭头：细胞未见明显变性脱落，可见少量炎症细胞浸润。

2.4 各组大鼠血清 IL-8、IL-10、COX-2 炎症因子水平 与空白组相比，模型组血清中 IL-8、COX-2 水平显著升高，IL-10 水平显著降低 (P<0.01)；与模型组相比，秋水仙碱组和刺血结合药线组 IL-8、COX-2 水平显著降低，IL-10 水平显著升高，具有统计学意义(P<0. 01)，刺血组和药线组 IL-8、COX-2 水平下降，IL-10 水平上升，差异具有统计学意义（P＜0.05）；刺血组、药线组与秋水仙碱组之间差异具有统计学意义（P＜0.01），刺血结合药线组与秋水仙碱组之间无统计学意义（P＞0.05）。详见表 2。

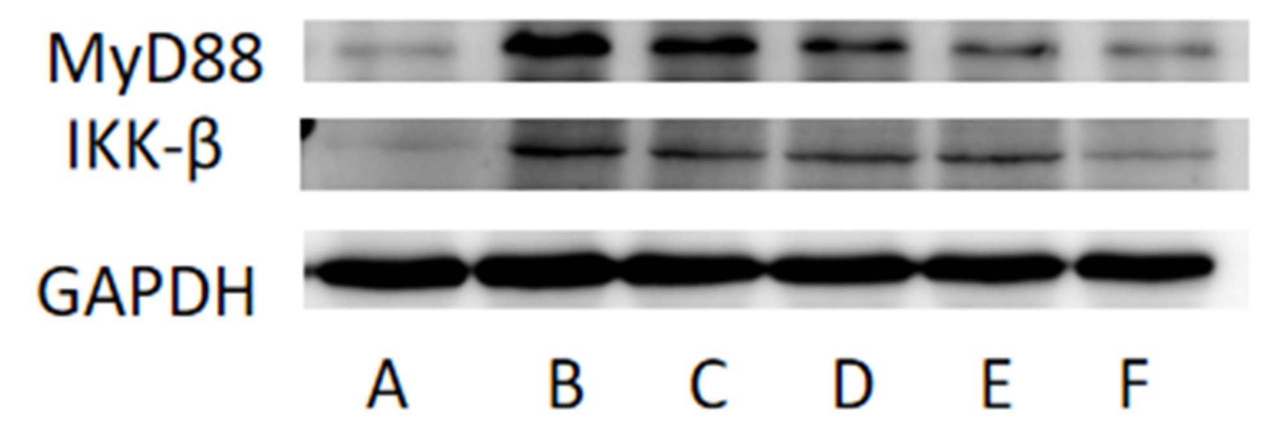
表 2 各组大鼠血清 IL-8、IL-10、COX-2 炎症因子水平 （n=10，pg/ml，$\bar{x}\pm s$）

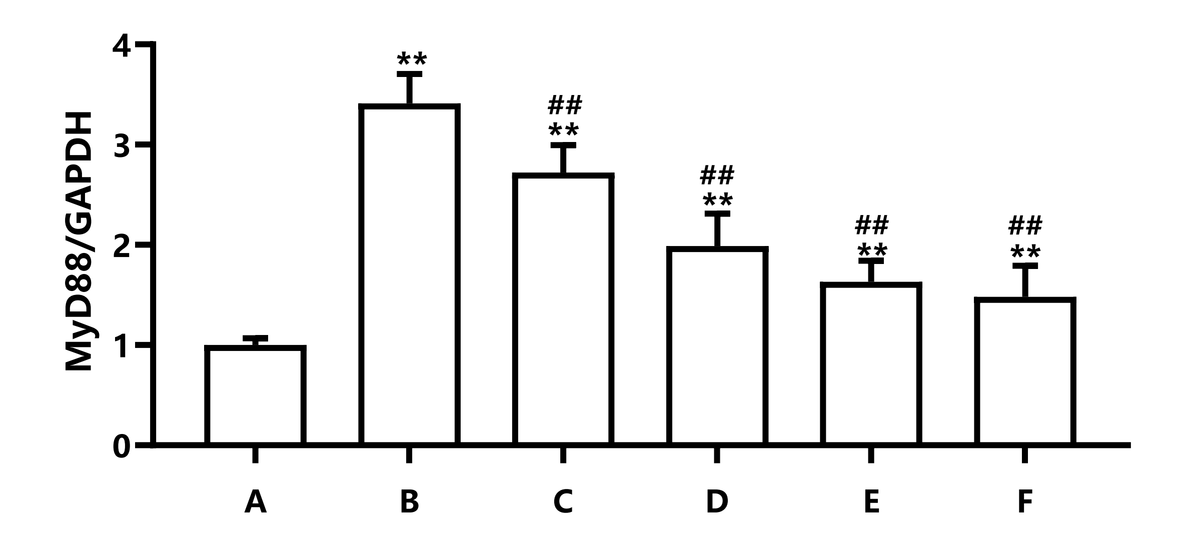
Table 2 Serum levels of IL-8, IL-10 and COX-2 in each group (n=10, pg/ml, X ±s)

组别	IL-8	IL-10	COX-2
空白组	10.39±4.96	58.59±13.49	6.78±4.83
模型组	76.06±11.07**	4.47±2.33**	62.58±10.16**
秋水仙碱组	36.27±7.34$^{\#\#}$	40.44±9.75$^{\#\#}$	25.32±6.95$^{\#\#}$
刺血结合药线组	30.48±10.62$^{\#\#▲}$	45.02±6.82$^{\#\#▲}$	23.87±10.19$^{\#\#▲}$
刺血组	67.12±9.87$^{\#\&}$	15.95±11.02$^{\#\&}$	54.13±8.95$^{\#\&}$
药线组	65.95±12.15$^{\#\&}$	14.94±10.01$^{\#\&}$	53.65±9.39$^{\#\&}$

注：与空白组比较，$^{**}P$<0.01；与模型组比较，$^{\#}P$<0.05，$^{\#\#}P$＜0.01；与秋水仙碱组相比，与空白组比较，$^{▲}P$＞0.05，$^{\&}p$ ＜ 0.01。

2.5 各组大鼠滑膜组织 MyD88/TLRs 信号通路相关蛋白的影响 与空白组相比，模型组大鼠关节滑膜组织 MyD88、IKK-β 蛋白表达显著升高(P＜0.01)；与模型组比较，治疗各组大鼠关节滑膜组织 MyD88、 IKK-β 均显著降低(P＜0.01）。详见图 2.





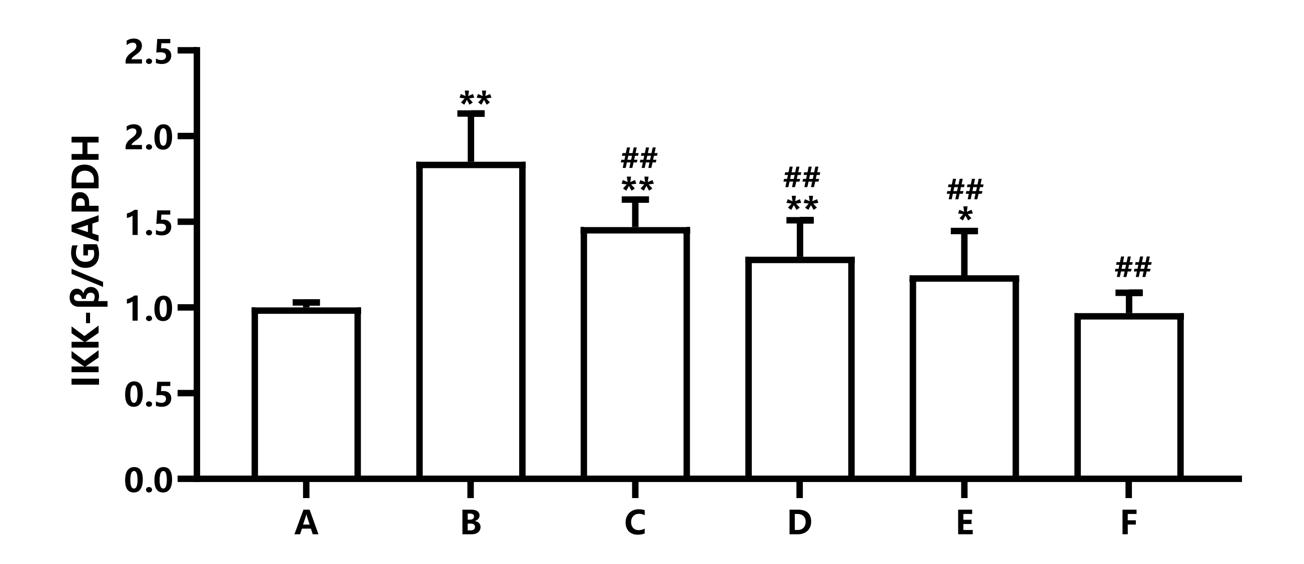


图 2　各组大鼠滑膜组织 MyD88/TLRs 信号通路相关蛋白的影响(mg/ml)

FIG. 2　Effects of MyD88/TLRs signaling pathway related proteins in synovial tissue of rats in each group(mg/ml)

注：A：空白组，B：模型组，C：药线组；D：刺血组；E：刺血结合药线组，F：秋水仙碱组；与空白组比较，*P<0.05，**P<0.01；与模型组比较，#P<0.05，##P<0.01。

3　讨论

急性痛风性关节炎的发生和发展一般是饮食、遗传、环境等多种因素共同作用的结果[9]，中医学认为急性痛风性关节炎属于“痹症”“白虎历节风”等范畴，“痛风”这一概念最早是由朱丹溪提出来的，《格致余论·痛风论》中记载：“痛风者，大率因血受热……寒凉外搏, 热血得寒, 汗浊凝滞, 所以作痛”。其病因病机主要为先天禀赋不足或机体感受外邪，邪气滞留关节，或内伤饮食，嗜食肥甘厚味，日久积而化热生痰, 瘀毒痰浊相杂痹阻关节所致。而西医学上则认为 MSU 结晶沉积是导致急性痛风性关节炎发生的关键因素，体内巨噬细胞可识别并吞噬 MSU，激活相关炎性信号转导通路并释放出一系列炎性因子，从而产生强烈的一系列炎症反应，引起剧烈疼痛，临床上一般表现为皮肤局部红肿，肤温升高，剧痛拒按等症状。本研究采取经典的 Coderre 法获取 AGA 大鼠模型，将 MSU 注射至大鼠右踝关节，其右踝表现与 AGA 临床症状基本相符合，结合滑膜组织病理学的改变，即滑膜组织表现不同程度损伤坏死、存在大量炎症细胞

浸润，说明造模成功。在本次研究中，模型组在造模后逐渐出现右踝关节肿胀，12h 达到高峰，经治疗后，秋水仙碱组、刺血组、药线组及刺血结合药线组均能不同程度缓解关节肿胀，其中造模 72h 后，空白组与刺血结合药线组大鼠右踝关节肿胀度无统计学意义（$P>0.05$），说明刺血疗法结合壮医药线点灸在改善踝关节肿胀方面最优。秋水仙碱组大鼠在治疗期间出现腹泻，考虑为秋水仙碱引起的胃肠道反应，而余治疗各组大便正常，说明在刺血疗法及壮医药线点灸不仅能有效改善 AGA 关节症状，且不良反应少。

《素向・调经论》中早有记载："血有余，则泻其盛经，出其血……"《灵枢・小针解》中也指出："满则泄之者，气口盛则当泄之也。宛陈则除之者，去血脉也。"道出了对于血实、热毒、湿热、气滞血瘀等的实证的疾病应当予刺血疗法来治疗，起到泄热、活血化瘀、调节气血、淤血去则新生等作用。在岭南地区因其特殊的地理环境气候造就了疾病多具有湿热瘀毒特征，壮医学认为"寒手热背肿在梅"，指的是肿块类型的疾病，可选择以最肿胀部位为中心，围着肿块围灸，呈梅花形分布，能软坚散结、活血消肿、解毒消炎。故从中医学结合民族医学的角度出发，刺血疗法结合壮医药线点灸可用于 AGA 的治疗。痛风性关节炎急性发作期间，MSU 晶体的吞噬作用能诱导细胞膜的溶解、溶酶体和炎症介质的释放，以及 MCP-1 、CXCL8、IL-8 等趋化因子把中性粒细胞募集到炎性组织中，这些过程都会引起持续的炎症反应[11][11]。在免疫系统中，细胞因子在炎症和感染期间参与免疫反应，是最重要的信使分子和效应分子之一。TLRs 参与机体的固有免疫，激活后既可促进多种炎症因子如 IL-1β、IL-8 等大量释放，进而在 AGA 炎症过程中产生炎症级联反应。故观察刺血疗法以及壮医药线点灸对 AGA 发病中的炎症因子是否存在着优良的影响，能否降低炎症反应，便可确定该治疗方法对 AGA 的应用价值。有研究表明[13]对于内毒素致热的家兔，与单纯拔罐疗法相比，刺血疗法结合拔罐疗法除了能抑制 GM-CSF、IL-1β、TNF-α、IL-6 炎性因子的水平以外，抗炎、退热作用更优。在沈谷丰错误!未找到引用源。等研究中采用中药结合刺络放血法治疗痛风性关节炎患者能有效降低促炎因子 TNF － α、IL － 8、IL － 1β 水平，利于尿酸的排泄，改善 GA 的临床症状。在壮医药线点灸联合针刺疗法治疗膝骨性关节炎研究当中[14]，IL-1β、IL-18 炎症因子水平明显下降，关节炎症得到改善，关节软骨的修复功能得到恢复。在本研究当中，IL-10 作为典型的抗炎细胞因子中的一种，其可以抑制促炎信号和免疫反应，减少炎症反应，改善临床症状[14]。IL-8 是趋化因子中的一种，参与着炎症反应的整个过程。COX-2 是一种诱导酶，调节着细胞的生长、迁移、增殖、自噬、凋亡和免疫反应，能促进前列腺素的合成，在组织损伤、炎症反应时表达较高，从而诱发明显的疼痛错误!未找到引用源。[18]。ELISA 检测结果显示模型组大鼠中 IL-8 和 COX-2 水平升高，IL-10 水平降低，说明 AGA 大鼠右踝关节出现过度的炎症反应，给予大鼠干预治疗后，AGA 大鼠 IL-8 和 COX-2 水平降低，IL-10 细胞因子水平升高，提示刺血疗法及壮医药线点灸对 AGA 炎症反应具有一定的抑制作用，且秋水仙碱组与刺血结合药线组之间差异无统计学意义（$P>0.05$），说明在两者疗效相当，相比单纯刺血疗法或壮医药线点灸疗法，两者结合疗效最好。通过本次研究，证实了刺血疗法结合壮医药线点灸治疗 AGA 大鼠能有效抑制促炎因子分泌以及促进抗炎因子的释放。对于炎症反应来说，降低炎症因子，控制炎症风暴反应至关重要，本次研究为刺血疗法结合壮医药线点灸治疗 AGA 提供了一定的可靠依据。

Toll 样受体 (TLR)是一个特征明确的模式识别受体家族，在 TLR 家族当中除了 TLR3 外，其他所有的 TLR 均需利用髓样分化初级反应 88 (MyD88)依赖性信号通路[19]。TLRs 属于I型跨膜蛋白，MyD88 是机体内十分重要的信号传导蛋白，也是 TLRs 先天免疫反应信号途径和信号通路中介导的重要关键接头分子，它是经典激活途径中炎症介质 NF-κB 所必需的，而 IκB 激酶 β (IKK-β) 作为 IKK 复合物的主要催化亚基，又是激活 NF-κB 所必需的，从而诱导许多促炎因子分泌和其他免疫反应很重要的蛋白质产生效应[20][21]。TLR/MyD88 信号转导通路是目前参与痛风性关节炎发病机制研究最多的信号通路之一，痛风性关节炎急性发作时，激活 Toll 样受体，并与病原体通过 MyD88 依赖性途径触发先天免疫反应并启动下游信号事件，调节多种相关炎症基因的表达，通过 MyD88 的 TIR 结构域传递细胞内信号，进而激活转录因子，从而促进多种炎症因子的释放，其中包括 IL-8、IL-1β、IL-6、TNF-α 等产生炎症反应[22]。有研究表明[23]痛风发作与体内 MSU 对 I 型跨膜蛋白受体及激活其下游信号通路有关，异牡荆素可以降低关节肿胀指数，减少炎症反应，改善 AGA 症状。由此可知，TLRs/Myd88 信号通路是改善 AGA 病情及减少炎症的作用靶点之一。在本研究中刺血疗法结合壮医药线点灸能显著抑制 AGA 大鼠滑膜 MyD88、IKK-β 蛋白的表达。此外，结合本研究

调控相关炎症因子水平来看，刺血疗法结合壮医药线点灸治疗 AGA 可以增强对相关炎症因子激活的抑制作用以及促进对抗炎因子的分泌，表明刺血疗法结合壮医药线点灸可以对 TLRs/MyD88 信号传导通路起到抑制作用，调节炎症因子，对 AGA 起到治疗作用。

综上所述，本研究结果表明刺血疗法结合壮医药线点灸能更好降低关节肿胀程度，减轻炎症反应，这与它下调 MyD88 和 IKK-β 表达有关，TLRs/MyD88 炎症反应信号转导通路的多靶点拮抗作用可能是该信号通路治疗 AGA 的抗炎机制之一。中医药以及民族医药是我们独有的宝库，希望通过本次研究能为刺血疗法结合壮医药线点灸治疗急性痛风性关节炎在临床工作中提供新的思路和相关理论依据，以期中医以及民族医学能得到更进一步的发展。

作者贡献：朱丹萌负责文章的构思、论文撰写及论文的修订；黄玉莹、罗统安、贺长源进行整理数据、研究结果的分析；陈日兰负责文章的质量控制及审校，对文章整体质量进行监督管理。

本文无利益冲突

[参考文献]

[1]Martins D, Tonon CR, Pacca RL, et al. Gout Storm. Am J Case Rep. 2021;22:e932683. doi:10.12659/AJCR.932683.

[2] 中华医学会内分泌学分会. 中国高尿酸血症与痛风诊疗指南(2019)[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2020,36(1):1-13. DOI:10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2020.01.001.

[3]Dehlin M, Jacobsson L, Roddy E. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence, treatment patterns and risk factors. Nat Rev Rheumatol. 2020;16(7):380-390. doi:10.1038/s41584-020-0441-1.

[4]Elfishawi MM, Zleik N, Kvrgic Z, et al. The Rising Incidence of Gout and the Increasing Burden of Comorbidities: A Population-based Study over 20 Years. J Rheumatol. 2018;45(4):574-579. doi:10.3899/jrheum.170806.

[5] 王旭, 罗冬平, 茹彦海, 等. 从慢性肾脏病角度看高尿酸血症与痛风的指南更新要点[J]. 中国全科医学, 2021,24(33):4191-4195. DOI:10.12114/j.issn.1007-9572.2021.00.573.

[6]Lin X, Shao T, Huang L, et al. Simiao Decoction Alleviates Gouty Arthritis by Modulating Proinflammatory Cytokines and the Gut Ecosystem. Front Pharmacol. 2020;11:955. doi:10.3389/fphar.2020.00955.

[7]蒙继勇, 肖敬, 蒋耀平, 等. 壮医药线点灸治疗类风湿关节炎合并周围神经病变的疗效观察[J]. 中华中医药杂志, 2019,34(8):3864-3866.

[8] 左政, 黄培冬, 王馨悦, 等. 基于 TLR4/IL-1β 信号通路探讨阿是穴刺血治疗痛风性关节炎疗效观察[J]. 上海针灸杂志, 2020,39(9):1176-1180. DOI:10.13460/j.issn.1005-0957.2020.09.1176.

[9]刘波, 周颖, 仝乐, 等. 刺血流派的源流及主要学术思想[J]. 中国针灸, 2022,42(4):451-456. DOI:10.13703/j.0255-2930.20210110-k0002.

[10]Wu ZD, Yang XK, He YS, et al. Environmental factors and risk of gout. Environ Res. 2022;212(Pt C):113377. doi:10.1016/j.envres.2022.113377.

[11]Galozzi P, Bindoli S, Doria A, et al. Autoinflammatory Features in Gouty Arthritis. J Clin Med. 2021;10(9):1880. doi:10.3390/jcm10091880.

[12]Szekanecz Z, Szamosi S, Kovács GE, et al. The NLRP3 inflammasome - interleukin 1 pathway as a therapeutic target in gout. Arch Biochem Biophys. 2019;670:82-93. doi:10.1016/j.abb.2019.01.031.

[13]裴莹, 陈泽林, 金颖, 等. 刺络拔罐法对内毒素致热家兔血清细胞因子水平的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019,37(6):1385-1388. DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2019.06.026.

[14]沈谷丰, 刘坚林, 陆佳龙. 萆薢除痹汤联合刺络拔罐治疗痛风湿热痹阻证疗效及对血清炎症因子的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2021,30(1):74-77. DOI:10.3969/j.issn.1008-8849.2021.01.016.

[15] 张燕珍, 梁超, 鲍春龄, 等. 壮医药线点灸联合针刺治疗寒湿痹阻型膝骨性关节炎的临床观察[J].

广州中医药大学学报, 2021,38(12):2656-2662. DOI:10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.12.019.

[16]Ouyang W, O'Garra A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. Immunity. 2019;50(4):871-891. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.020.

[17]Niranjan R, Mishra KP, Thakur AK. Inhibition of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Initiates Autophagy and Potentiates MPTP-Induced Autophagic Cell Death of Human Neuroblastoma Cells, SH-SY5Y: an Inside in the Pathology of Parkinson's Disease. Mol Neurobiol. 2018;55(10):8038-8050. doi:10.1007/s12035-018-0950-y.

[18]Chen H, Qian Z, Zhang S, et al. Silencing COX-2 blocks PDK1/TRAF4-induced AKT activation to inhibit fibrogenesis during skeletal muscle atrophy. Redox Biol. 2021;38:101774. doi:10.1016/j.redox.2020.101774.

[19]Li L, Acioglu C, Heary RF, et al. Role of astroglial toll-like receptors (TLRs) in central nervous system infections, injury and neurodegenerative diseases. Brain Behav Immun. 2021;91:740-755. doi:10.1016/j.bbi.2020.10.007.

[20]Balka KR, De Nardo D. Understanding early TLR signaling through the Myddosome. J Leukoc Biol. 2019;105(2):339-351. doi:10.1002/JLB.MR0318-096R.

[21]Lu W, Meng Z, Hernandez R, et al. Fibroblast-specific IKK-β deficiency ameliorates angiotensin II-induced adverse cardiac remodeling in mice. JCI Insight. 2021;6(18):e150161. doi:10.1172/jci.insight.150161.

[22]Wang X, Zhou J, Yang J, et al. Role of TLR4/MyD88/NF-κB signaling in the contrast-induced injury of renal tubular epithelial cells. Exp Ther Med. 2020;20(5):115. doi:10.3892/etm.2020.9243.

[23]Sun X, Li P, Qu X, et al. Isovitexin alleviates acute gouty arthritis in rats by inhibiting inflammation via the TLR4/MyD88/NF-κB pathway. Pharm Biol. 2021;59(1):1326-1333.doi:10.1080/13880209.2021.1979595.